

Biotecnología animal

¿Cual es el objetivo de realizar Biotecnología animal?

- A. Se pueden generar animales modificados (“animales transgénicos”) para muchos propósitos, que sirvan de modelos a enfermedades humanas o introducir nuevos caracteres a animales importantes en producción como vacas o peces
- B. Métodos genéticos como selección asistida por marcadores (MAS) ayuda a identificar zonas en el cromosoma con caracteres importantes como crecimiento
- C. Los genes se pueden transferir a través de especies, familias e incluso reinos como resultado de tecnología del DNA recombinante
- D. Los principales objetivos de la biotecnología animal son razas que sean más nutritivas y animales económicamente más productivos, incrementen el crecimiento y desarrollo, así como anticuerpos y producción de vacunas

Métodos de transferencia de genes en animales

Para insertar un gen correctamente en un animal, el gen (denominado el transgen) necesita expresarse en el momento adecuado y la cantidad y lugar adecuado del animal

Promoters y secuencias reguladoras son esenciales

El gen se debe incorporar al cromosoma para una expresión adecuada

Métodos de transferencia de genes en animales

Microinyección

1. La inyección del gen de interés en un huevo fertilizado de un animal donador
2. El gen debe ser insertado antes que la primera división celular de tal modo que todas las células del animal contienen el gen

FIGURE 7.3

Microinjection of DNA into the pronucleus of a bovine egg after centrifugation has moved the cytoplasm to make the pronuclei more visible.

N. L. First, *J. Reprod. Fert. Supply*, 41:3-14 (1990). Used by permission.

3. Los pasos en el proceso son:
 - a. Identificación (y a veces modificación por mutación) de un gen de interés
 - b. Inserción del gen de interés en el vector apropiado
 - c. Microinyección del DNA dentro del pronucleo de un huevo fertilizado
 - d. Implantación del huevo microinyectado en una madre de alquiler
 - e. Permitir el desarrollo del embrión hasta su nacimiento
 - f. Demostración que el gen ha sido incorporado de manera estable en el genoma huésped y es heredado en la descendencia
 - g. Demostrar que el gen se expresa y es correctamente regulado en el organismo del huésped



Courtesy of R. L. Brinster, University of Pennsylvania, Philadelphia.

FIGURE 7.1

Two 10-week-old sibling male mice, one of them the product of genetic engineering experiments. The mouse on the left harbors a new gene comprising the mouse metallothionein promoter fused to the rat growth hormone structural gene. This mouse weighs 44 g, whereas its control sibling weighs 29 g.

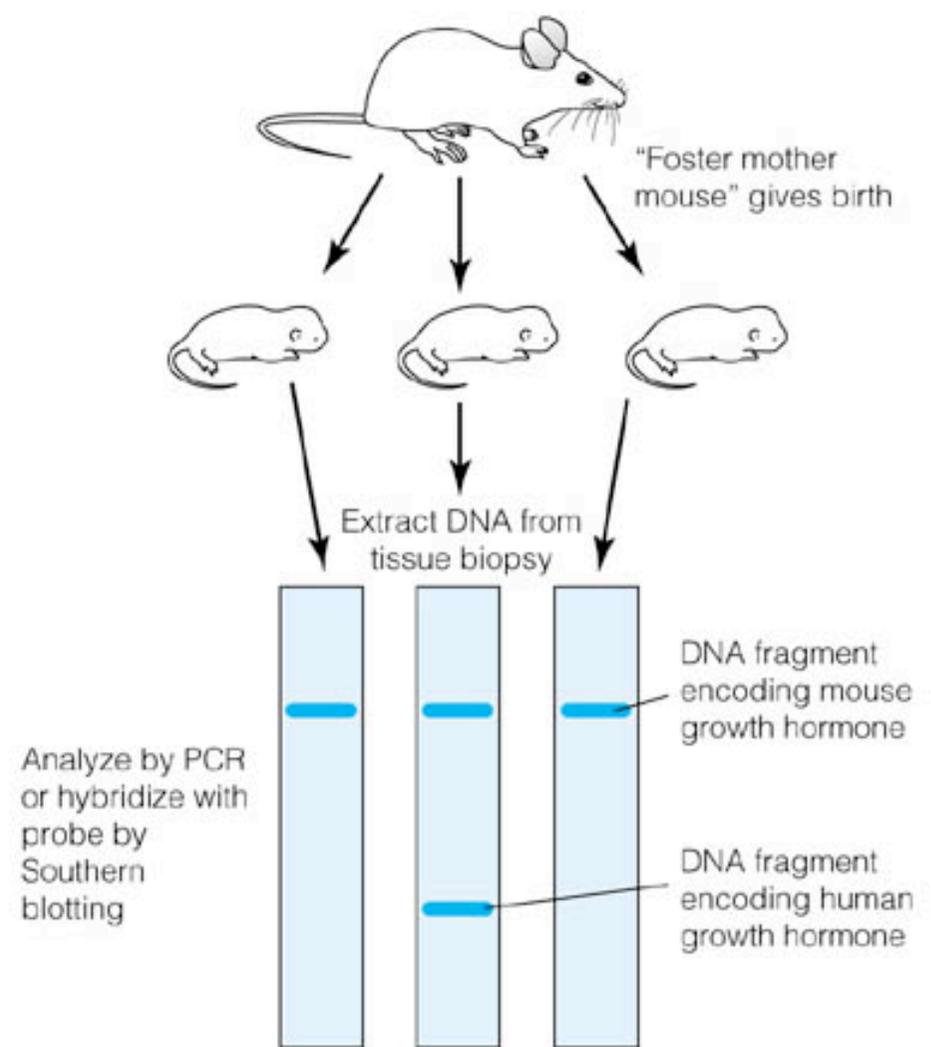
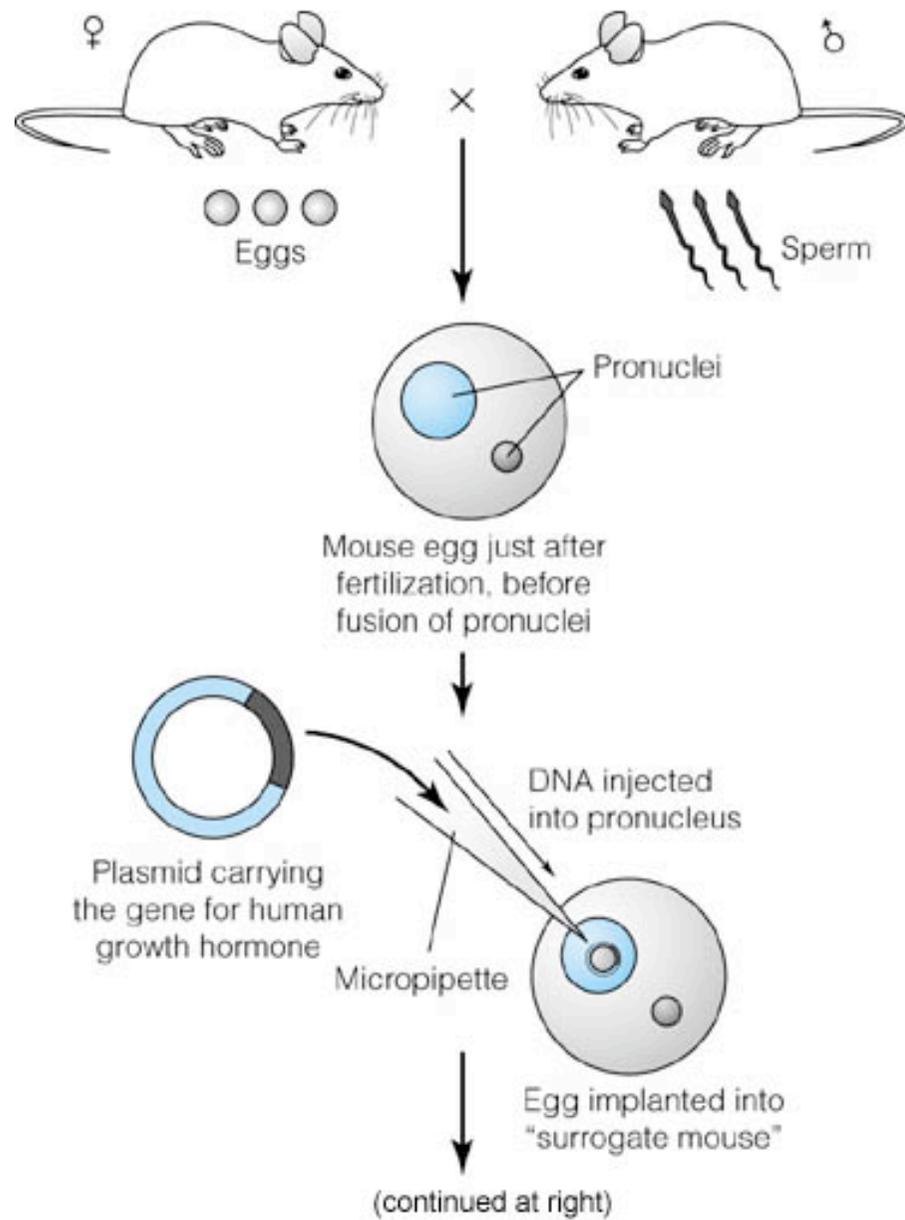


FIGURE 7.2
The production of transgenic mice.

4. Animales fundadores, que son los animales que tienen el nuevo gen en las células germinales (reproductivas) se cruzan para establecer nuevas líneas genéticas con las características de interés
5. Se ha desarrollado la Microscopía diferencial de interferencia de manera que el el núcleo de los huevos son visibles para insertar en las madres lo antes posible
6. Problemas potenciales:
 - a. Sobreviven pocos huevos inyectados
 - b. El gen se inserta al azar en los cromosomas
 - c. No todas las células del animal reciben el gen
 - d. El gen no se expresa lo suficiente

Transferencia génica de célula madre embrionaria

1. (ES) Células indiferenciadas que se dividen para producir células diferenciadas mientras mantienen sus características de indiferenciadas (llamadas células pluripotentes)
2. Células madre embrionarias “Embryonic stem (ES) cells” se usan para promover reemplazamiento génico dirigido (recombinación homóloga) de manera que el gen se inserta en el cromosoma adecuado
3. Los pasos son los siguientes:
 - a. Células ES se extraen del embrión
 - b. El gen de interés se inserta en las células (llamado “transfección”)
 - c. El gen es dirigido por recombinación homóloga y marcadores de selección
 - d. Las células ES con el gen adecuado se inyectan en embriones parcialmente desarrollados denominados “blastocitos”, que se implanta en una madre
 - e. La descendencia es cribada por el carácter de interés
4. Se puede usar para modelos de enfermedades humanas como la enfermedad de Gehrig, cancer, Alzheimer, fibrosis cística

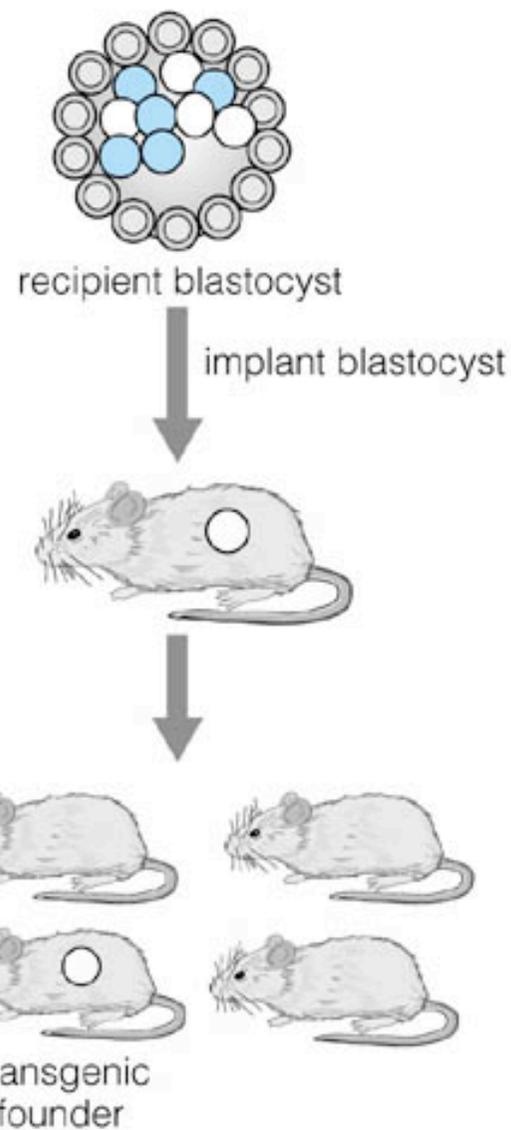
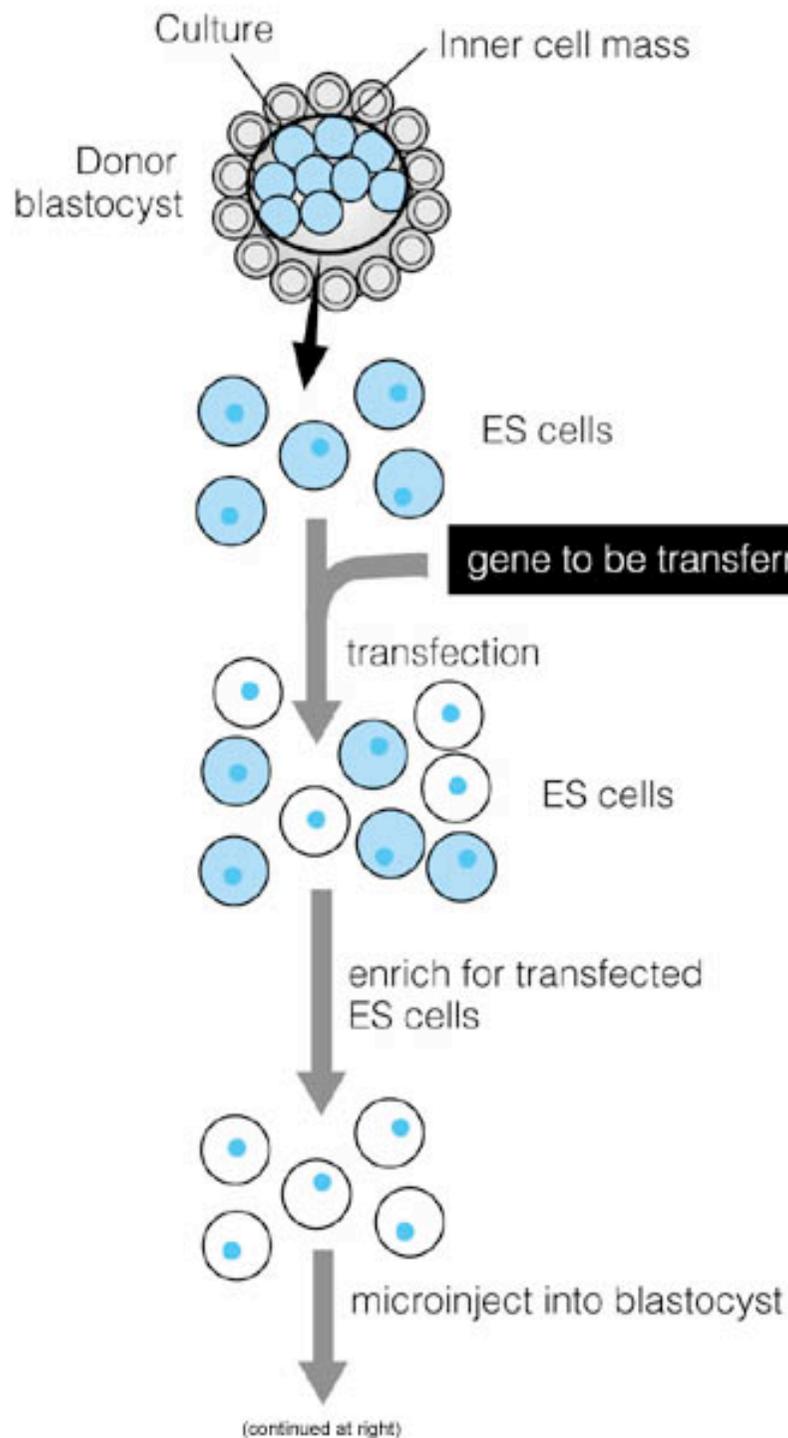


FIGURE 7.4
Production of transgenic mice by the transfer of embryonic stem cells containing a gene of interest.

Problemas con recombinación homóloga

Recombinación no-homóloga frecuente

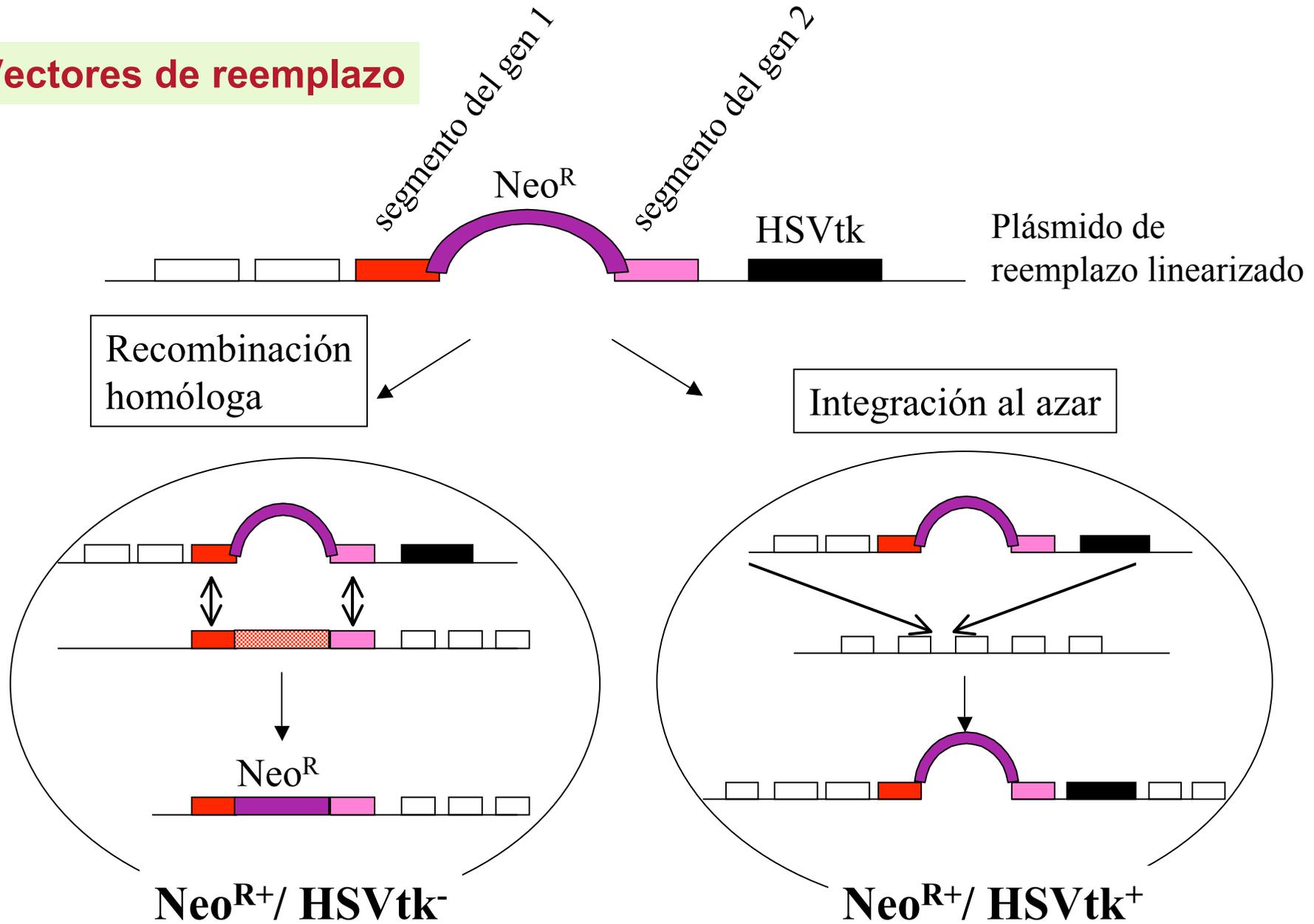
Solución: vectores de reemplazo

La construcción KO contiene 1) **Gen neoR**
Flanqueado por 2) **2 segmentos de gen objetivo**
y 3) **El gen HSVtk**

Parte del gen se **reemplaza** con neoR

Células ES se seleccionan por la integración NeoR y contra la integración de HSVtk* (NeoR+/ HSVtk-) en **ganciclovir**

Vectores de reemplazo



HSVtk convierte ganciclovir en una droga tóxica y mata células HSVtk+

5. Puede inactivar gene para monitorizar el efecto en crecimiento o para desarrollar tratamientos
6. Mutagénesis dirigida en ratón
 - a. Inserción de DNA en un lugar específico del cromosoma
 - b. Genes se pueden también inactivar (llamado KO)
 - c. Los pasos en crear ratones KOs son:
 - 1) Un gen se inactiva al eliminar una parte del gen e insertar un gene de resistencia a antibiótico en su lugar. DNA homólogo donde la recombinación va a ocurrir flanquea ambos lados del marcador. El DNA insertado también lleva un gen que produce la piel negra
 - 2) El gen se transfiere a células madres embrionarias. La células contendrán dos copias del gen de interés y dos copias del de del gen de piel negra (en homocigosis)

- 3) Las células se criban con antibióticos para determinar la correcta inserción del DNA
 - 4) Las células madre embrionarias se transfieren a embriones de ratón tempranos
 - 5) Los embriones se implantan en madres se permite su nacimiento
 - 6) La descendencia tendrán piel blanca y negra, siendo la piel negra un marcador para el gen eliminado. Esto se llama una quimera, o sea un ratón con células normales y células modificadas
 - 7) La descendencia se cruzan con un ratón blanco y cualquier ratón completamente negro será un ratón KO, conteniendo el gen inactivado en cada célula. Esto muestra que el gen inactivado está presente en todas las células
- d. El maíz KO se confirma para el gen diana por PCR

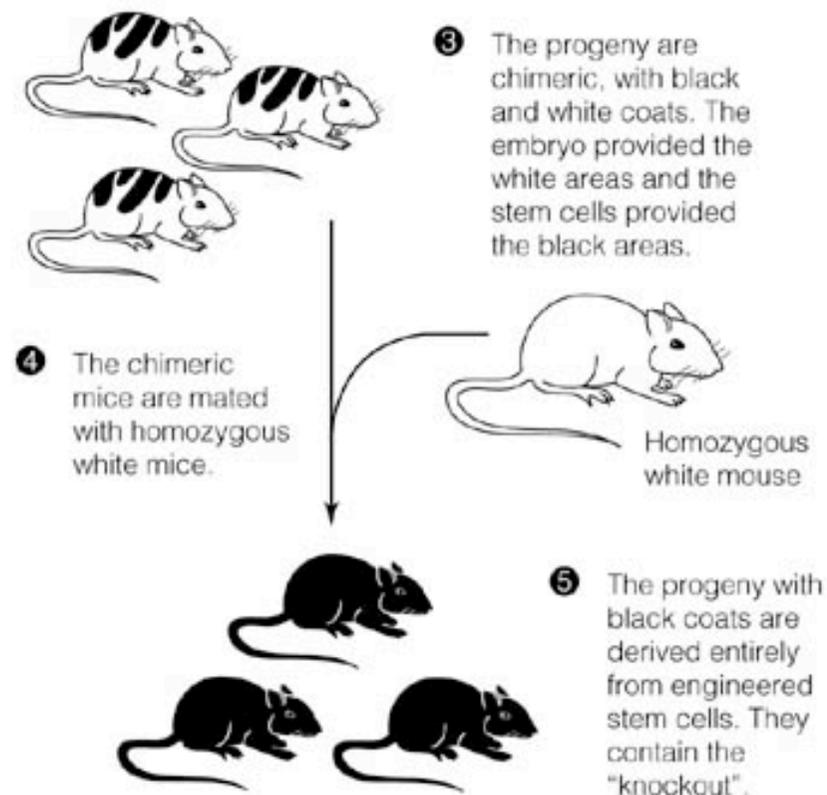
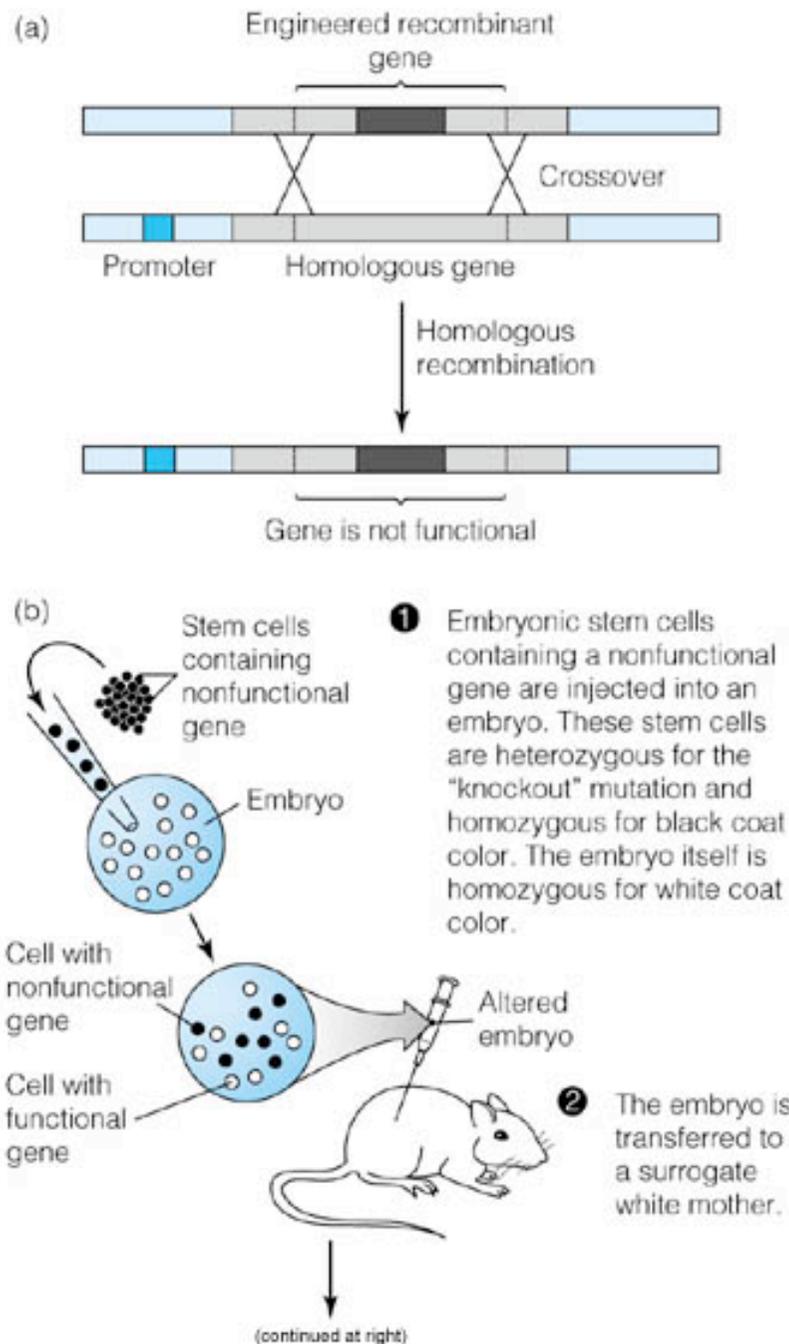


FIGURE 7.5
The production of knockout mice.
 Through homologous recombination (a), a selected gene is inactivated and (b) transferred into embryonic stem cells.

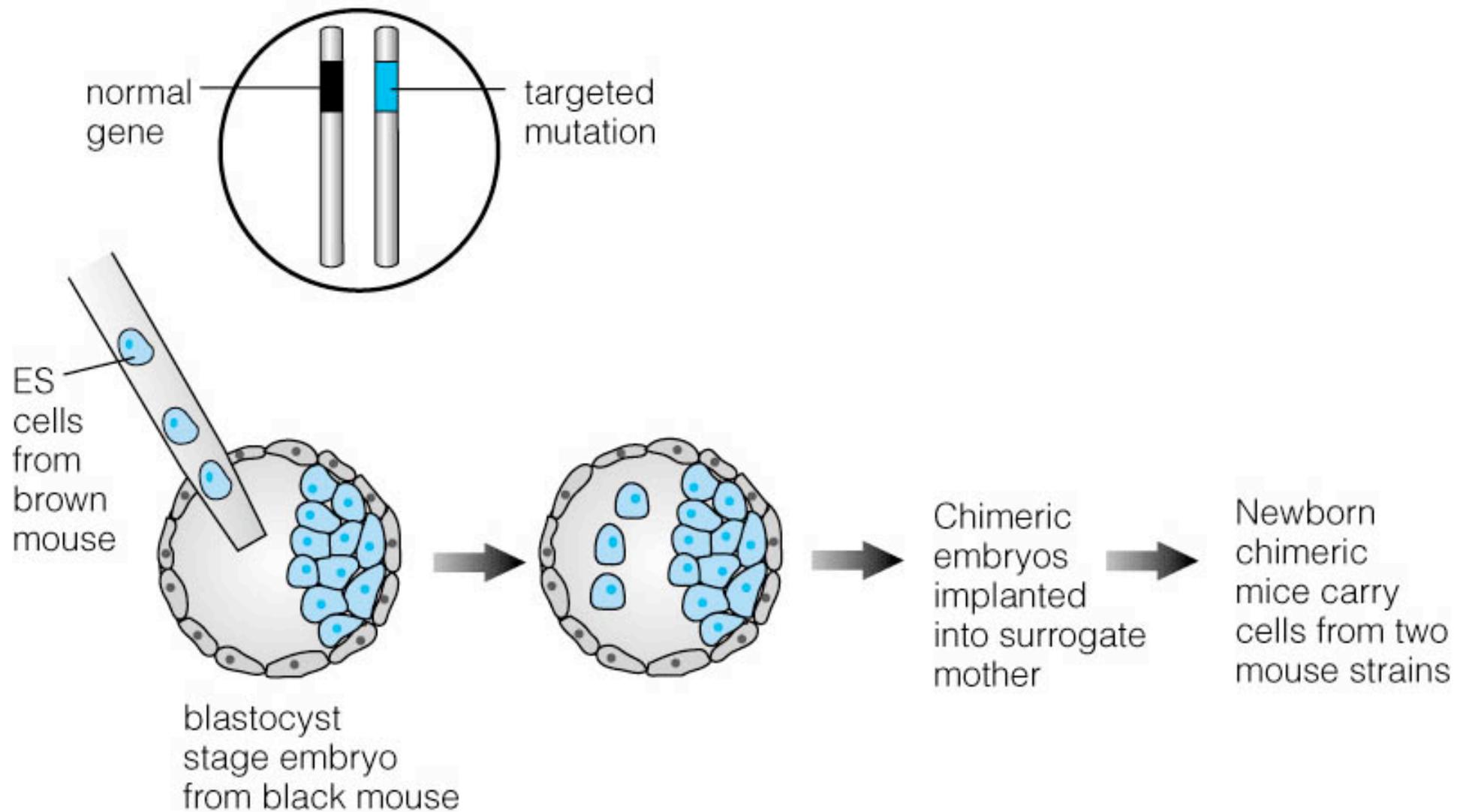


FIGURE 7.6

Transfer of mouse ES cells into embryos. Coat color is a marker to determine incorporation of ES cells into embryos.

Retrovirus y transferencia génica

1. Puede infectar a un animal de manera muy eficiente e integrar DNA en genomas
2. Usa RNA como genoma e infecta células sin matarlas
3. Durante la infección el RNA se convierte en DNA por la enzima transcriptasa reversa. El DNA se integra en el genoma de la célula huésped expresándose los genes víricos y formando el virus
4. Puede infectar diferentes tipos celulares con una sola copia de DNA, pero solo puede llevar pequeñas cantidades de DNA
5. Si el virus se usa como vector, el virus es inactivado eliminando los genes necesarios para el empaquetamiento y transcripción reversa

Animales transgénicos y sus aplicaciones

- A. Animales transgénicos tiene genes eliminados (Knockout, KO) o genes añadidos (Knockin, KI) dependiendo de la aplicación del animal
- B. Ratones
 1. Se usa como modelo para enfermedades humanas bien por KO del gen or reemplazando el gen normal con un gen mutado
 2. Es posible usarlos como factorías vivas:
 - a. Productos transgénicos como factor IX de coagulación en leche animal
 - b. El gen de interés se debe expresar bajo un promotor específico de mamas
 - c. Las proteínas que se secretan en la leche son más fáciles de aislar porque se pueden unir a la membrana plasmática de células de grasa producida en la leche

C. Vacas

1. Producidas por microinyección de huevos siguiendo los pasos siguientes:
 - a. Coleccionar óvulos de terneras sacrificadas
 - b. Maduración del óvulo in vitro
 - c. Fertilización del óvulo in vitro
 - d. Microinyección de DNA en el pronúcleo masculino
 - e. Desarrollar los embriones hasta el estadio de blástula
 - f. Cribar células de embriones es estado de blástula por el gen insertado (transgen) usando PCR
 - g. Implantar los embriones en vacas recién fertilizada
 - h. Nacimiento de terneros
2. Ingeniería genética se usa en alterar composición de la leche para producir proteínas humanas, como insulina, eritropoietina (EPO), y anticuerpos monoclonales

3. Se pueden generar vacas con una mayor resistencia a enfermedades, reduciendo la cantidad de vacunas, antibióticos y visitas de veterinarios
4. Somatotropina bovina recombinante (rBST) ha sido aprobada como droga animal y permite a las vacas incrementar la producción de leche hasta un 25%. La controversia es que aunque se ha probado que la rBST no es tóxica en humanos y las vacas no tienen mayor cantidad de proteínas en su cuerpo

D. Cerdos, Ovejas y Cabras

1. Modificadas por ingeniería genética como bioreactores para producir proteínas como factores VIII y IX de coagulación, hormona del crecimiento e interleukinas
2. Las proteínas se pueden secretar en leche de ovejas y cabras sin efecto en los animales

3. Cerdos transgénicos tienen problemas como letargo, piel más gruesa, problemas de hígado, úlceras y artritis
4. El único éxito con cerdos ha sido con somatotropina de cerdo producida en E. coli y usado para tratar cerdos
5. Xenotransplante
 - a. El uso de órganos animales en pacientes humanos
 - b. Cerdos es el animal elegido puesto que son fácil de crecer y cruzar, tiene órganos de tamaño similar al humano y pueden ser modificados genéticamente.
 - c. Preocupaciones sobre la tecnología incluye aspectos éticos, uso de órganos animales en humanos, y enfermedades como retrovirus endógenos porcinos (PERV), similar a HIV, que se puede transmitir a humanos

- d. El mayor obstáculo es impedir la respuesta inmune por el cuerpo humano. Cerdos alterados genéticamente con antígenos de superficie modificados, y la producción de cerdos sin una copia del gen implicada en respuesta inmune
- e. La primera aplicación será más probablemente el trasplante de isletas celulares porcinas productoras de insulina de cerdos KO (que no producen insulina de cerdo) para tratar diabetes. Corazón e hígado serán los primeros órganos transplantados

E. Revolución biotecnológica: Humanización de tejidos y órganos de cerdos

1. PPL Therapeutics ha producido el primer cerdo clonado con un gen inactivado que codifica la enzima 1,3 galactosil transferasa (GT), que cataliza el movimiento de galactosa a la superficie de las células del cerdo
2. El sistema inmune humano, que reconoce la galactosa en células extrañas ataca células o tejidos con el azúcar, causando el rechazo de órganos

3. Cerdos con KO en los dos genes GT se están investigando, junto con cerdos enanos que con tienen PERV y son deseables para xenotransplantes
4. Los receptores usados por el PERV para entrar células se han caracterizado, y un método de cribado se ha desarrollado para identificar si el PERV está en células animales, asegurando la inocuidad del xenotransplante

Aves

1. Productos de granja como el pollo se puede mejorar disminuyendo el contenido de grasa y colesterol de los huevos
2. Los huevos pueden servir como bioreactores para producir proteínas valiosas a través de conseguir que secreten proteínas valiosas dentro del huevo
3. Los retrovirus son candidatos para la transfección de embriones en estado de blatodermos. Los problemas mayores es la inestabilidad del gen introducido y el pequeño tamaño. La estructura del óvulo hace difícil la penetración por microinyección
4. El uso de liposomas en un posible sistema de transformación de células del blastodermo. Células transformadas se insertan en embriones del huesped debajo del espacio subgerminal para producir un animal quiméricoL

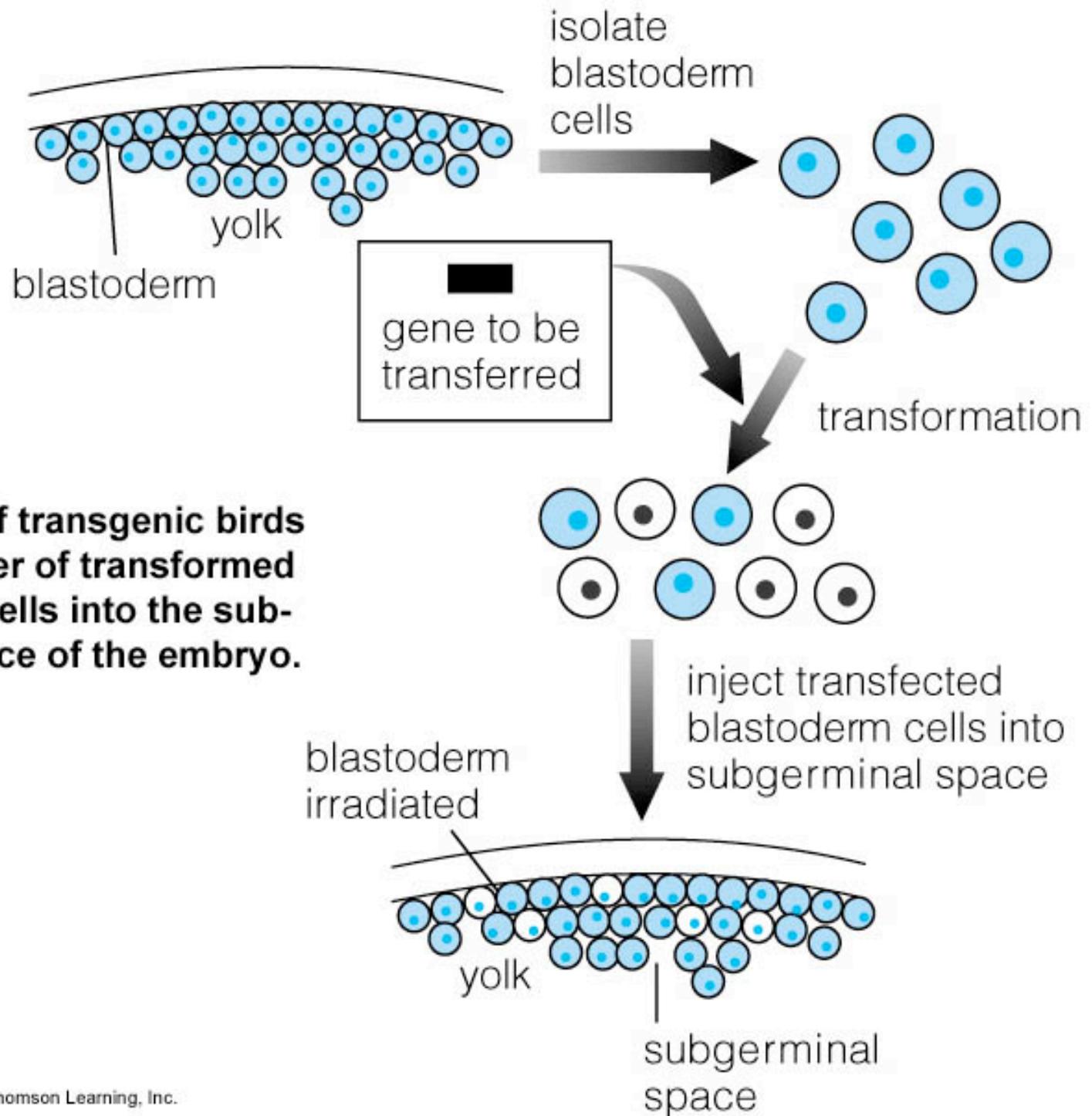


FIGURE 7.7

Production of transgenic birds by the transfer of transformed blastoderm cells into the subgerminal space of the embryo.

Propagación animal

A. Inseminación artificial

1. Permite animales de interés genético ser cruzados más eficientemente, permitiendo el esperma diluido de un un toro ser inseminado entre 500 y 1000 vacas
2. Usado en ternero para incrementar la frecuencia de caracteres de interés
3. Ha incrementado la diversidad genética de animales en extinción entre zoológicos

B. Clones animales

1. Clonación de germoplasmas vivos (lifestocks) ha sido común durante los últimos 20 años
2. Las células se pueden separar después de fertilizar (entre 8 y 19 células), y los embriones se pueden desarrollar como gemelos. Esto se ha intentado en humanos pero producen embriones defectivos y no se implantaron



College of Biology and Agriculture, Brigham Young University.

FIGURE 7.8

Two different sets of identical Holstein calf twins that were produced by embryo splitting. The two calves on the right came from one embryo, and the ones on the left derived from a different embryo.

3. Métodos de transferencia nuclear incrementa el número de descendientes de una hembra a cientos o miles
 - a. La primera clonación animal con éxito fué el de una oveja en 1986, pero los estudios se iniciaron en los 1950s, donde núcleos de células en diferentes estados de desarrollo se transfirieron a óvulos enucleados (sin núcleo) para estudiar el desarrollo de una rana leopardo
 - b. La comercialización permite caracteres de interés ser propagados y mantenidos en organismos vivos, para aplicaciones en agricultura y medicina

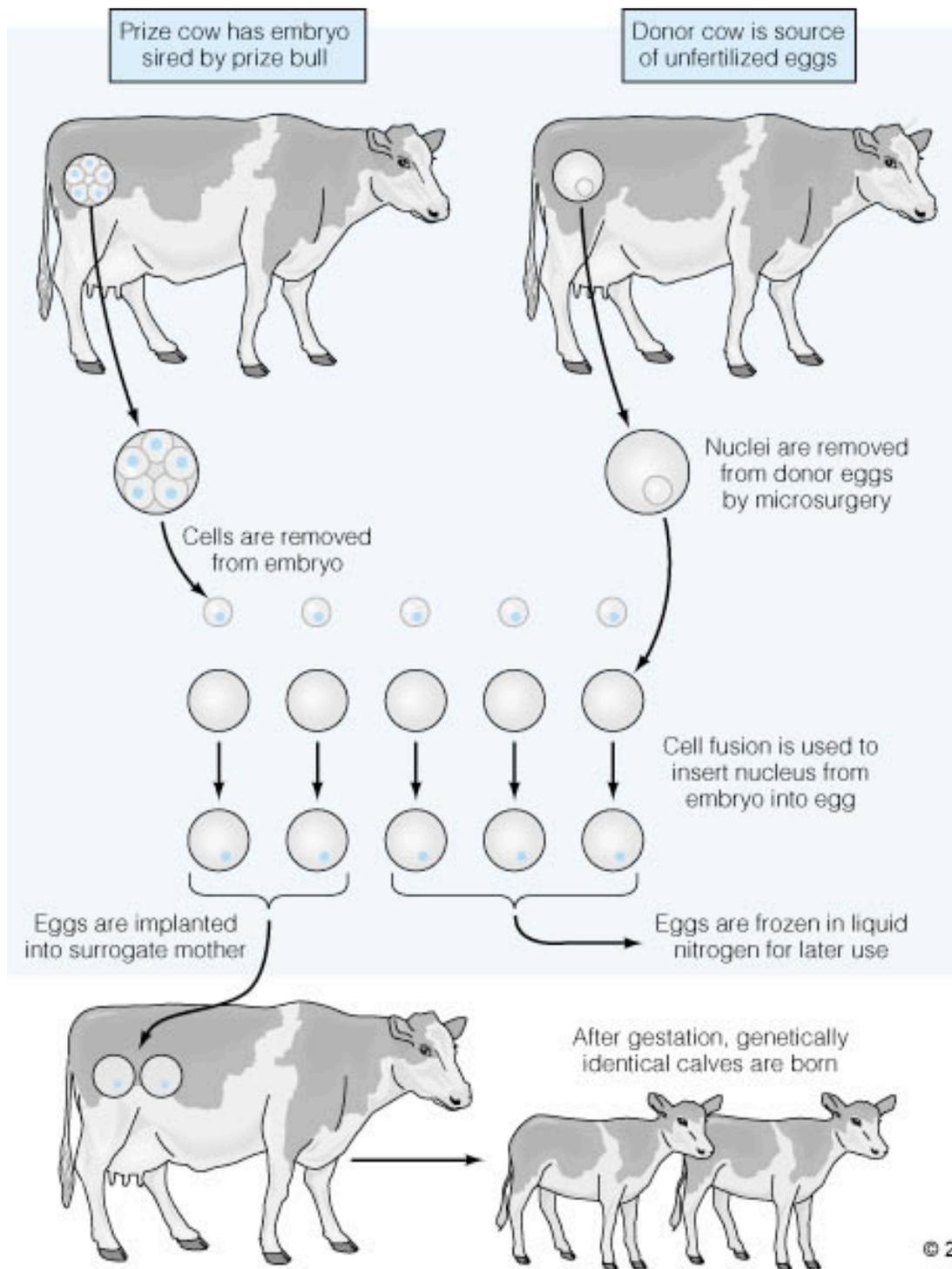


FIGURE 7.9

The production of cloned cows by cell fusion of enucleated donor eggs with cells removed from an embryo.

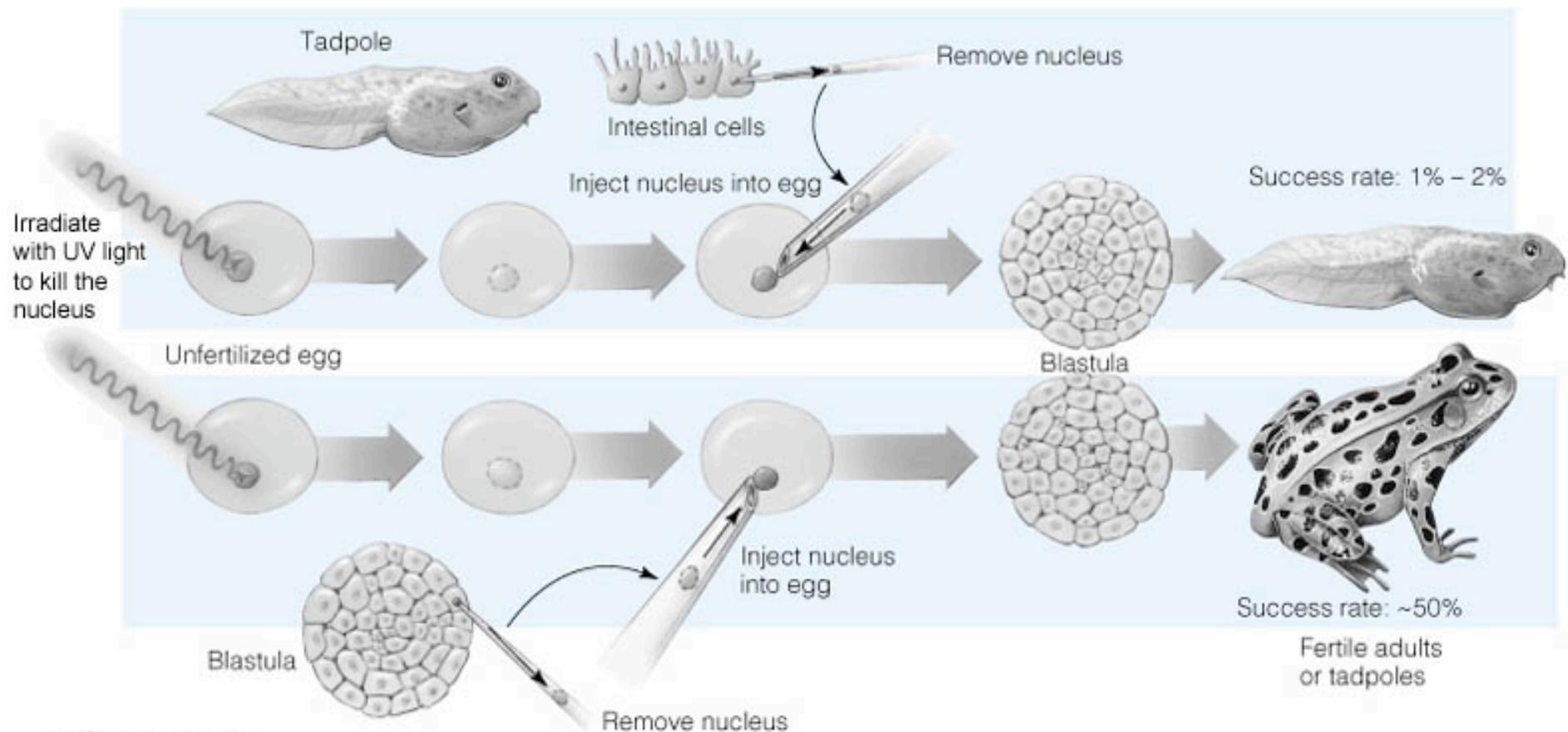


FIGURE 7.10

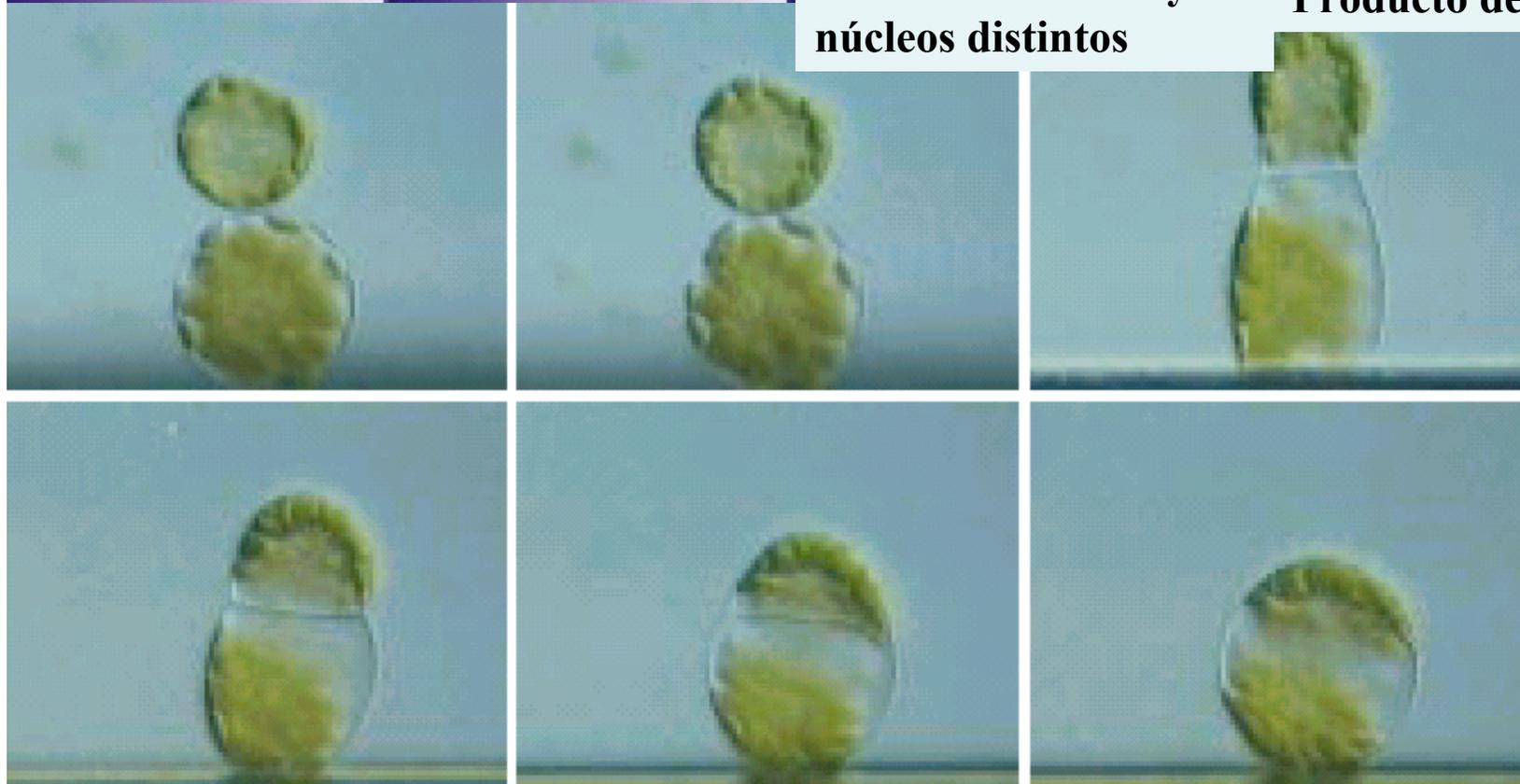
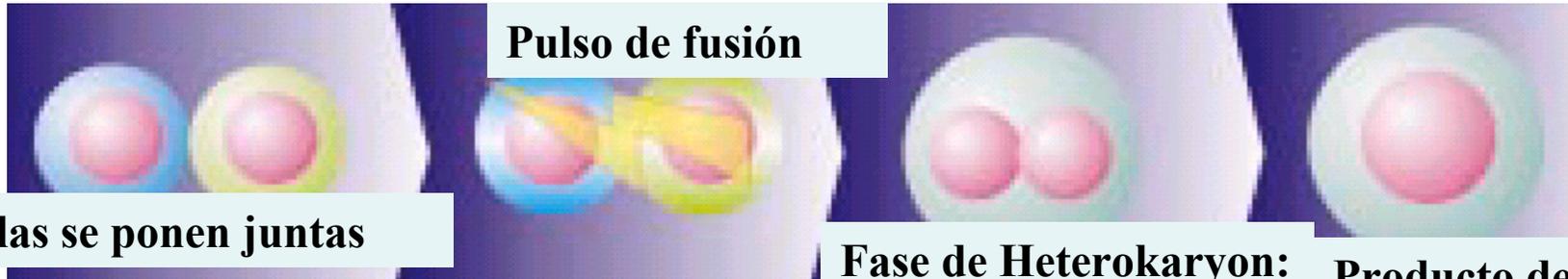
The demonstration of nuclear totipotency.

Amphibian nuclear transfer experiments show that early embryonic cells have the ability to direct the development of a complete frog. However, the rate of success decreases dramatically when nuclei from later developmental stages are used. In the South African clawed frog, nuclei from tadpole epithelial intestine cells are able to direct the development of embryos—1–2% of the embryos develop into a normal frog (top panel). In the leopard frog, embryos produced from nuclei taken from late developing embryonic cells (after gastrula stage) do not develop.

4. La clonación de Dolly

- a. Se realizó en 1996 en el instituto Roslyn en Escocia y fue la primera vez que un animal fue clonado usando células somáticas
- b. El método usado fue:
 - 1) A células de ovulo en metafase se les eliminó el núcleo
 - 2) Una célula mamaria de oveja en cultivo se le eliminó los nutrientes para que entre en el ciclo estacionario G0
 - 3) Las dos células se fusionaron por choque eléctrico (electrofusión)
 - 4) Las células que se desarrollaron en cultivo para formar un embrión se introdujeron en una madre preparada hormonalmente para implantación
 - 5) El embrión se desarrolló totalmente y el genotipado de DNA confirmó que Dolly era un clon
- c. Dolly murió en 2003 de un cáncer de pulmón normalmente encontrado en ovejas de más edad; análisis de DNA demostró que los telómeros eran más cortos de lo normal
- d. La controversia permanece, no está claro si Dolly fue clonada de una célula mamaria o de una célula madre embrionaria. Se necesitaron 277 para clonar Dolly, lo que lo hace muy ineficiente

Electrofusión



Fusión inducida por un pulso eléctrico

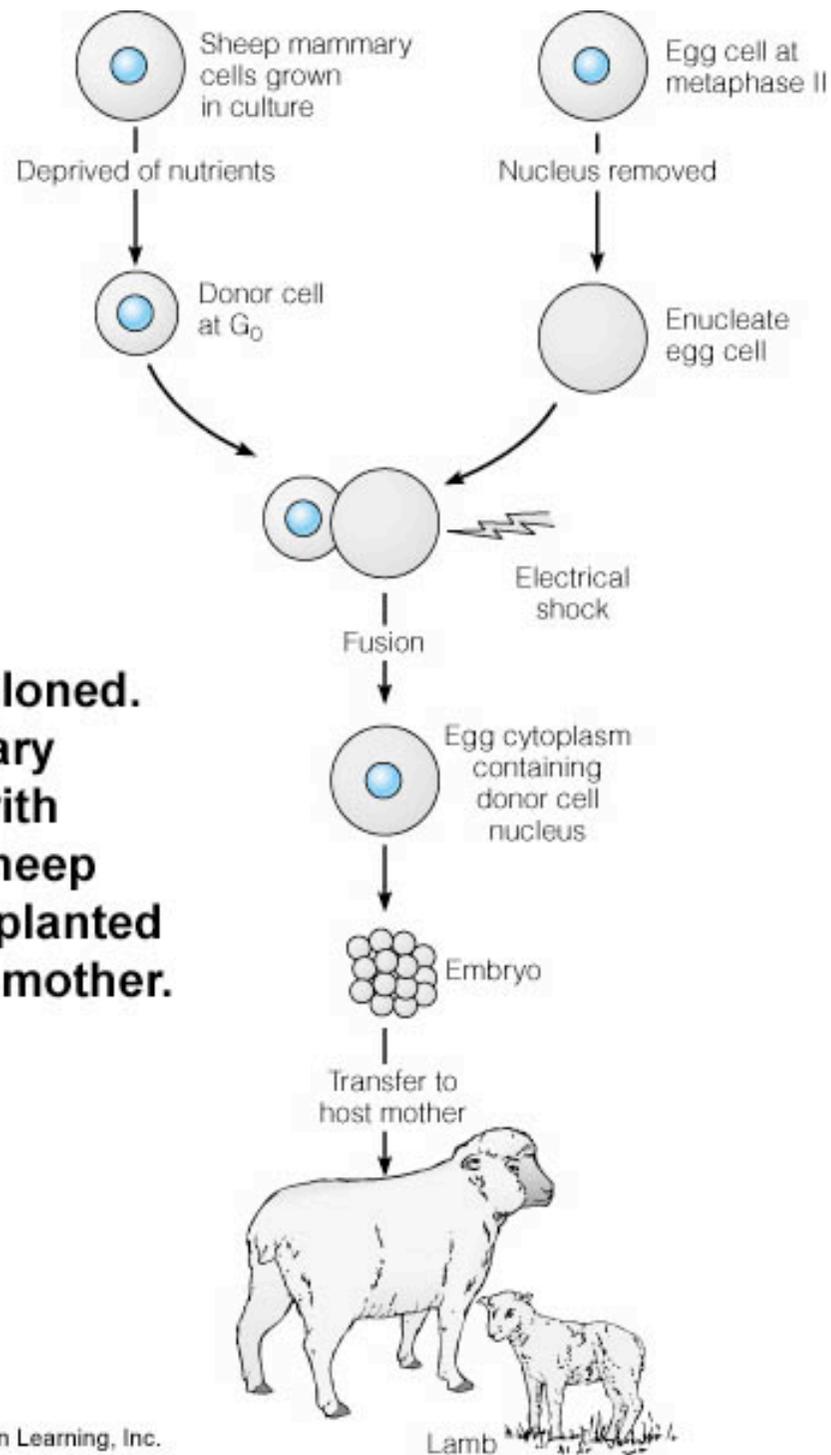


FIGURE 7.11

How Dolly was cloned. An adult mammary cell was fused with an enucleated sheep egg and then implanted into a surrogate mother.

5. ¿por que armó tanto revuelo? Porque clonar puede producir desarrollos importantes:
 - a. Se puede estudiar los efectos ambientales en animales idénticos
 - b. La genética de las enfermedades puede estudiarse en más detalle
 - c. Se puede estudiar la genética del desarrollo en más detalle
 - d. Animales modificados genéticamente y clonados posteriormente pueden producir grandes cantidades de proteínas terapéuticas humanas en la leche
6. Ratones se clonaron en 1998 usando una inyección de núcleo en óvulos enucleados, y se han clonado cabras, conejos y gatos



Le Corre-Riberio/Liaison Agency.

FIGURE 7.12

Dolly the sheep with her surrogate mother. Dolly was cloned by nuclear fusion of an adult cell with an enucleated egg.

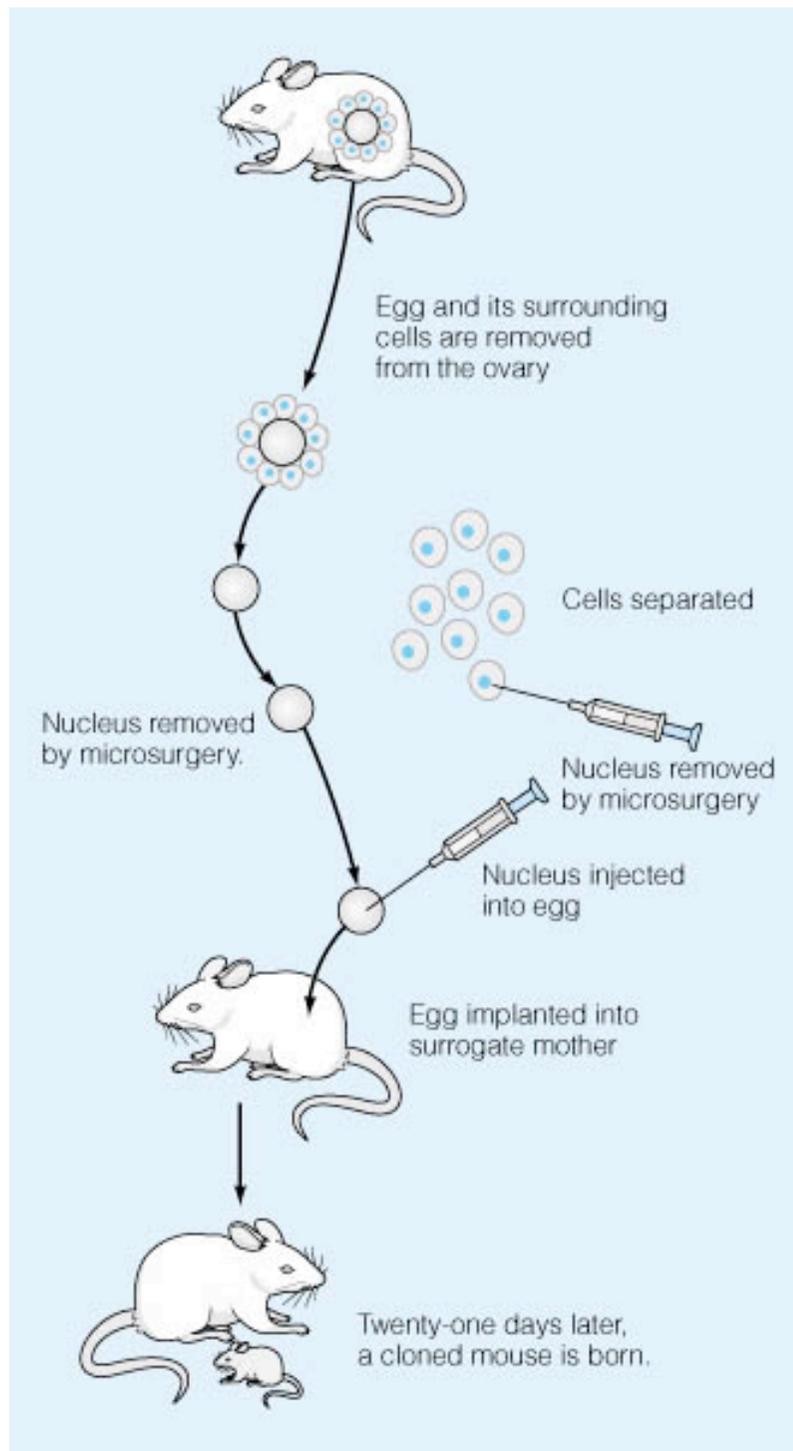


FIGURE 7.13

The method for cloning mice.

A nucleus from a differentiated cell is removed and directly injected into an enucleated egg.

Developing embryos are transferred to surrogate mothers.

Regulación de animales transgénicos

- A. Mucho más preocupación pública de animales que de plantas transgénicas, debido a su efecto potencial en el medio ambiente, el riesgo a la salud de consumir alimentos modificados genéticamente
- B. La crítica tiene preocupación porque la FDA quiere regular animales modificados genéticamente de la misma manera que drogas animales, animales transgénicos pueden ser aprobados demasiado rápido y sin la revisión del gobierno

Patente de animales modificados genéticamente

- A. En 1930 el congreso de los EEUU aprobó el Acto de patentes, pero plantas no se patentaron hasta 1970. En 1987, la oficina de patentes de EEUU declaró que organismos multicelulares no humanos que no ocurren normalmente, incluyendo animales se pueden patentar
- B. Patentes, trademarks, copyrights, y andtrade secrets se consideran propiedad intelectual y hay un gran debate por desarrollos en biotecnología en los últimos 15 años. Mucho debate se ha generado en patentes animales
- C. Se incluye interrogantes sobre posibles consecuencias de los usos comerciales de organismos patentados, incluyendo implicaciones medioambientales, la salud del animal modificado y efectos potenciales del proceso evolutivo
- D. Agricultores están preocupados de patentes animales, puesto que animales patentados pueden generar un menor número de granjas y más potentes y pequeños granjeros no pueden tener la nueva tecnología o animales
- E. Discusiones abiertas sobre aspectos éticos, sociales, y legales osn importatnes para asegura el progreso adecuado de la biotecnología